

Diss. ETH Nr. 10769

21. Juli 1994

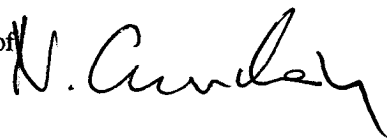
The Genetic Organization of the Prechorismate Pathway in Tomato

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZÜRICH

for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by
Jörn Görlach
Dipl. Biochemiker
Universität Hannover
born January 2, 1962
in Hamburg

Accepted on the recommendation of
Prof. Dr. N. Amrhein, examiner
Prof. Dr. K. Apel, co-examiner
PD Dr. J. Schmid, co-examiner



Zürich 1994

Partially published in *Plant Molecular Biology* **23**, 697-706 (1993)
Plant Molecular Biology **23**, 707-716 (1993)
Planta **193**, 216-223 (1994)

Abstract

To investigate a possible transcriptional regulation of the prechorismate pathway in higher plants, cDNAs and genes encoding enzymes of the pathway were isolated from tomato. By comparing known primary structures of 3-deoxy-D-*arabino*-heptulosonate 7-phosphate (DAHP) synthases and chorismate synthases, respectively, conserved protein domains were identified, corresponding degenerate oligonucleotides designed, used as primers in polymerase chain reaction (PCR) with tomato leaf cDNA as template, and gene-specific PCR fragments were isolated. Using these fragments as probes to screen a tomato leaf cDNA library cDNAs encoding two different isoforms of DAHP synthase (DHS1, DHS2) and chorismate synthase (CS1, CS2), respectively, were isolated. For DAHP synthase, a differential expression in tomato organs was found: DHS1 was expressed in all organs and DHS2 was mainly expressed in stems and roots. CS1 transcripts were most abundant in flowers and roots, less abundant in stems and were almost not detectable in leaves and cotyledons. A similar pattern was found for CS2, but absolute abundance was clearly lower. Using a quantitative Northern dot blot assay, tissue-specific expression patterns of genes coding for shikimate kinase (SK) and 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase (EPSPS) were found to resemble the patterns of CS1 and CS2, but not of DHS1 or DHS2. When transcript levels of whole gene families and not of genes coding for single isoenzymes of the pathway were compared, all patterns were similar to each other and also to the organ-specific abundance of tomato phenylalanine ammonia-lyase (PAL) encoding transcripts. Upon incubation of tomato suspension cultured cells with fungal elicitor, levels of transcripts coding for DHS2, SK, EPSPS, CS1, and PAL increased 15 to 30 fold in an co-ordinated manner within the first 4 hours, whereas levels of transcripts encoding DHS1 and CS2 were not affected. Neither the inhibition of ethylene biosynthesis by aminoethoxyvinylglycine, nor inhibition of PAL by 2-aminoindan-2-phosphonic acid affected induction of the genes investigated. Genes encoding CS1 and CS2 were isolated from tomato. Both genes have 12 introns at corresponding positions that vary in lengths between 81 and 1700 bp. Tissue specific alternative splicing of primary transcripts coding for CS2 generates further diversity of CS subunits, and different activities for homoooligomeric CS isoforms *in vivo* and *in vitro* were observed.

Zusammenfassung

Um eine mögliche transkriptionelle Regulation des Prechorismat Weges in höheren Pflanzen zu untersuchen, wurden cDNAs und Gene aus Tomate isoliert, die für Enzyme dieses Weges codieren. Primärstrukturen von jeweils aus anderen Organismen bekannten 3-Deoxy-D-arabino-heptulosonat 7-Phosphat (DAHP) Synthasen und Chorismat Synthasen wurden verglichen, konservierte Protein Domänen wurden identifiziert und für diese codierende, degenerierte Oligonukleotide entworfen. Diese wurden als Primer in einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verwendet, in der cDNA aus Tomatenblättern als Template diente, und genspezifische PCR Fragmente wurden isoliert. Diese Fragmente wurden als Sonden zum Screenen einer cDNA Bank aus Tomatenblättern benutzt und es konnten cDNAs isoliert werden, die für jeweils zwei unterschiedliche DAHP Synthasen (DHS1, DHS2) und Chorismat Synthasen (CS1, CS2) codieren. Die DAHP Synthasen zeigten unterschiedliche Expressionsmuster in Tomatenorganen, wobei DHS1 in allen Organen und DHS2 vor allem in Stengel und Wurzel exprimiert wird. Für CS1 wurden grössere Mengen Transkripte in Blüte und Wurzel gefunden, weniger im Stengel und fast keine in Blättern und Keimblättern. CS2 zeigte ein ähnliches Expressionsmuster, aber das gesamte Expressionsniveau war deutlich niedriger. Durch Anwendung einer quantitativen Northern Dot Analyse wurden organspezifische Expressionsmuster für Gene der Shikimatkinase (SK) und der 5-Enolpyruvylshikimat 3-Phosphat Synthase (EPSPS) bestimmt. Diese waren denen der beiden CS sehr ähnlich, nicht aber denen der beiden DAHP Synthasen. Vergleicht man relative Mengen von Transkripten von ganzen Genfamilien und nicht von Transkripten, die für einzelne Isoenzyme des Weges codieren, miteinander, so sind alle Muster untereinander und auch im Vergleich zum organspezifischen Expressionsmuster der Phenylalanin Ammonium-Lyase (PAL) sehr ähnlich. Nach Inkubation von Tomaten-Suspensionskulturen mit einem Elicitor aus der Zellwand eines Pilzes stiegen die relativen Gehalte an Transkripten für DHS2, SK, EPSPS, CS1 und PAL koordiniert um das 15 bis 30fache innerhalb der ersten 4 Stunden. Dabei wurden die Gehalte von Transkripten, die für DHS1 und CS2 codieren, nicht verändert. Weder die Hemmung der Ethylen Biosynthese durch Aminoethoxy-Vinylglycin noch die Hemmung von PAL durch 2-Aminoindan-2-Phosphonsäure beeinflussten die Induktion der untersuchten Gene. Die Gene, die für CS1

und CS2 codieren, wurden aus Tomate isoliert. Beide Gene haben jeweils 12 Introns an entsprechenden Stellen, die in ihrer Länge zwischen 81 und 1700 Basenpaaren variieren. Gewebespezifisches alternatives Splicen von Primärtranskripten des CS2 Genes führt zu einer erhöhten Vielfalt an CS Untereinheiten und unterschiedliche Aktivitäten von homooligomeren CS Isoformen wurden *in vivo* und *in vitro* beobachtet.